

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-040898

(43)Date of publication of application : 12.02.1992

(51)Int.Cl. C12P 11/00  
// (C12P 11/00  
C12R 1:01 )  
(C12P 11/00  
C12R 1:38 )  
(C12P 11/00  
C12R 1:05 )  
(C12P 11/00  
C12R 1:15 )  
(C12P 11/00  
C12R 1:13 )  
(C12P 11/00  
C12R 1:365 )  
(C12P 11/00  
C12R 1:06 )

(21)Application number : 02-148723

(71)Applicant : NITTO CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 08.06.1990

(72)Inventor : ENDO RYUICHI  
TAMURA KOJI  
YAMAGAMI TOMOHIDE  
KOBAYASHI ETSUKO

## (54) BIOLOGICAL PRODUCTION OF ALPHA-HYDROXY-4-METHYLTHIOBUTYRIC ACID

## (57)Abstract:

PURPOSE: To produce  $\alpha$ -hydroxy-4-methylthiobutyric acid industrially and advantageously, by using a bacterium having hydrolyzing activity of  $\alpha$ -hydroxy-4-methylthiobutyronitrile.

CONSTITUTION:  $\alpha$ -Hydroxy-4-methylthiobutyronitrile is converted into  $\alpha$ -hydroxy-4-methylthiobutyric acid by hydrolysis reaction by action of bacterium. A bacterium belonging to the genus Caseobacter, Pseudomonas, Alcaligenes, Corynebacterium or Brevibacterium, Nocardia, Rhodococcus or Arthrobacter may be cited as the bacterium used. The culture is carried out under an aerobic condition at pH 4-10 and at 20-50° C.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Best Available Copy

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平4-40897

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成4年(1992)2月12日

C 12 P 7/42  
//C 12 P 7/42  
C 12 R 1:01)  
(C 12 P 7/42  
C 12 R 1:38)  
(C 12 P 7/42  
C 12 R 1:06)  
(C 12 P 7/42  
C 12 R 1:13)

8114-4B

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称  $\alpha$ -ヒドロキシイソ酪酸の生物学的製造法

⑯ 特 願 平2-148725

⑰ 出 願 平2(1990)6月8日

⑱ 発 明 者 遠 藤 隆 一 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日東化学工業株式会社中央研究所内

⑲ 出 願 人 日東化学工業株式会社 東京都千代田区丸の内1丁目5番1号

明 細 書

1. 発明の名称

$\alpha$ -ヒドロキシイソ酪酸の生物学的製造法

2. 特許請求の範囲

$\alpha$ -ヒドロキシイソブチロニトリルを微生物の作用による加水分解反応により $\alpha$ -ヒドロキシイソ酪酸に変換する $\alpha$ -ヒドロキシイソ酪酸の製造法において、使用する微生物が、ロドコッカス(Rhodococcus)属、シュードモナス(Pseudomonas)属、アースロバクター(Arthrobacter)属またはブレヴィバクテリウム(Brevibacterium)属に属し、該ニトリルを加水分解する能力を有するものであることを特徴とする $\alpha$ -ヒドロキシイソ酪酸の生物学的製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は $\alpha$ -ヒドロキシイソ酪酸の生物学的製造法に関する。 $\alpha$ -ヒドロキシイソ酪酸は有機合成原料として有用な化合物であるのみならず、こ

れを脱水してメチルエステル化することによりメタクリル樹脂の原料モノマーとして重要なメタクリル酸メチルに変換することができる。

(従来の技術と問題点)

ニトリル化合物を微生物学的に加水分解し対応する酸を製造する方法としていくつかの提案があり、 $\alpha$ -ヒドロキシニトリルの加水分解に関しては、例えば、バチルス属、バクテリジウム属、ミクロコッカス属、ブレヴィバクテリウム属の微生物によるラクトニトリルまたはヒドロキシアセトニトリルからの対応する酸の生産(特公昭58-15120号公報参照)、トルロブシス属酵母による対応する $\alpha$ -ヒドロキシニトリルからの光学活性なL- $\alpha$ -ヒドロキシバレリアン酸およびL- $\alpha$ -ヒドロキシイソカプロン酸の生産(Fukuda Y., et al., J. Ferment. Technol. 51 393 (1973) 参照)、コリネバクテリウム属の微生物を用いたグリコニトリル、ラクトニトリルおよびアセトンシアンヒドリンの加水分解による対応する $\alpha$ -ヒドロキシ酸の生産(特開昭61-56086号公報参照)および

アルカリゲネス属、シュードモナス属、ロドシュードモナス属、コリネバクテリウム属、アシネトバクター属、パチルス属、マイコバクテリウム属、ロドコッカス属またはキャンディダ属に属する微生物による $\alpha$ -ヒドロキシニトリルからの光学活性な $\alpha$ -ヒドロキシ酸の生産〔特開平2-84198号公報参照〕などが知られている。

しかしながら、 $\alpha$ -ヒドロキシイソブチロニトリルからの $\alpha$ -ヒドロキシイソ酪酸の生産に関しては唯一コリネバクテリウム属の微生物を用いた方法〔前記、特開昭61-56086号〕があるのみであり、同公報にみる限り該微生物はグリコロニトリル、ラクトニトリルに対しては高い加水分解活性を有するがアセトンシアニドリン( $\alpha$ -ヒドロキシイソブチロニトリル)に対しては僅かな活性しか有しない。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明者らは $\alpha$ -ヒドロキシイソブチロニトリルから $\alpha$ -ヒドロキシイソ酪酸を生成する微生物について高い加水分解活性を有し、しかも生成し

た $\alpha$ -ヒドロキシイソ酪酸を分解する性質のない微生物の探索を鋭意行った結果、ロドコッカス属、シュードモナス属、アースロバクター属、ブレビバクテリウム属に属する微生物に目的とする活性を見出し本発明を完成した。

すなわち、本発明は、 $\alpha$ -ヒドロキシイソブチロニトリルを微生物の作用による加水分解反応により $\alpha$ -ヒドロキシイソ酪酸に変換する $\alpha$ -ヒドロキシイソ酪酸の製造法において、使用する微生物が、ロドコッカス(*Rhodococcus*)属、シュードモナス(*Pseudomonas*)属、アースロバクター(*Arthrobacter*)属またはブレビバクテリウム(*Brevibacterium*)属に属し、該ニトリルを加水分解する能力を有するものであることを特徴とする $\alpha$ -ヒドロキシイソ酪酸の生物学的製造法、である。

本発明で使用する微生物は、具体的には、ロドコッカス ロドクロウス(*Rhodococcus rhodochrous*) ATCC 12674, ATCC 19140 および ATCC 33258、ロドコッカス エリスロポリス(*Rhodococcus ery-*

*thropolis*) IFM 155, IFO 12320 および IFO 12538、シュードモナス sp. SK13 (微工研菌寄第11309号)、アースロバクター sp. HRI (微工研菌寄第11301号) およびブレビバクテリウム アセチリカム(*Brevibacterium acetyllicum*) IAH 1790 が挙げられ、またこれらの変異株を用いることもできる。

これらの微生物のうちロドコッカス ロドクロウス ATCC 12674, ATCC 19140, ATCC 33258、ロドコッカス エリスロポリス IFO 12320, IFO 12538、ロドコッカス エリスロポリス IFM 155 およびブレビバクテリウム アセチリカム IAH 1790 は公知であり、各々アメリカン タイプカルチュアコレクション(ATCC)、財団法人菌研研究所(IFO)、千葉大学真核微生物研究センター(IFM) および東京大学応用微生物研究所(IAH) から容易に入手することができる。その他の微生物は本発明者らにより自然界から新たに分離されたものであり、各々上記寄託番号にて工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されており、その菌学的性質

は以下の通りである。

SK13およびHRI 菌株 NT: 試験せず

	SK13	HRI
形 態	桿 菌	多形性桿菌
グラム染色性	-	+
芽 胞	-	-
運 動 性	+	-
鞭 毛	極 毛	NT
オキシダーゼ	+	-
カタラーゼ	+	+
集菌の周辺細胞の伸長	NT	認めず
嫌気下での生育	NT	-
細胞壁のクサリ酸	NT	リジン
グリコリル試験	NT	-(7274型)
細胞壁の糖組成アラビノース	NT	-
ガラクトース	NT	-
キノン系	NT	HK-9(H <sub>2</sub> )
rod-coccus cycle	NT	+
O F	O	NT

以上の菌学的性質をBergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1986に従って分類するとSK13はシュードモナス属およびBB1はアースロバクター属に属する細菌とそれぞれ同定された。

次に本発明の一般的実施態様について説明する。本発明に使用される微生物の培地には酵素誘導物質としてプロピオニトリルやイソブチロニトリルなどのニトリル化合物、またはアセトアミド、プロピオアミドなどのアミド化合物を添加し、炭素源としては通常質化し得るグルコース、グリセロールなどを、窒素源としては硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウムなどを、また無機栄養素としては塩化マグネシウム、塩化第二鉄などを使用することができる。またこれらの培地に酵母エキス、肉エキスなどの天然培地を添加したものを用いることができる。

培養条件は好気条件下でpH 4~10、温度20~50℃の範囲で選べばよく、培養日数は1~10日の範囲で活性が最大となるまで培養すればよい。

加水分解反応は液体培地、または平板培地上に

て培養した菌体を採取し、必要に応じ固定化菌体、粗酵素、固定化酵素などの菌体処理物を調製し、水、緩衝液中にて $\alpha$ -ヒドロキシイソブチロニトリルと接触させればよい。菌体使用量は0.01~10重量%、 $\alpha$ -ヒドロキシイソブチロニトリル濃度は0.01~50重量%、反応温度は5~60℃、好ましくは10~40℃、反応pHは4~11、好ましくは6~10で、0.5~100時間反応させればよい。

かくして $\alpha$ -ヒドロキシイソブチロニトリルは直接、もしくは $\alpha$ -ヒドロキシイソブチルアミドを経由して $\alpha$ -ヒドロキシイソ酪酸に転換、蓄積される。

生成物の単離は濃縮、イオン交換、電気透析、抽出、晶析などの公知の方法を利用して行うことができる。

#### 〔発明の効果〕

本発明は $\alpha$ -ヒドロキシイソブチロニトリルの加水分解活性を有する微生物を用いることにより常温、常圧という温和な条件下で反応を進行でき $\alpha$ -ヒドロキシイソ酪酸の工業的に有利な製造法

を提供するものである。

#### 〔実験例〕

次に、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1

##### (1) 培養

表1に示す微生物を下記の条件で培養した。

##### i) 培地〔単位：W/V〕

グリセロール	2 %
酵母エキス	0.3 %
りん酸一カリウム	0.68 %
りん酸二ナトリウム	0.71 %
硫酸ナトリウム	0.28 %
塩化マグネシウム	0.04 %
塩化カルシウム	0.004 %
硫酸マンガン	$4 \times 10^{-4}$ %
塩化鉄	$6 \times 10^{-3}$ %
硫酸亜鉛	$3 \times 10^{-3}$ %
寒天	1.8 %

pH

7.5

さらに、誘導剤としてイソブチロニトリル (IBN) 0.2 %または $\alpha$ -クロルプロピオニトリル (CPN) 0.05 %を添加した。

##### ii) 培養条件

斜面培地から1白金耳の菌体を採り、上記平板培地上に塗布し、30℃で48時間好気条件下に培養した。

##### (2) 加水分解反応

平板培地から菌体を採取し遠心分離により各々の菌体を0.05 Mりん酸緩衝液 (pH 6.0) で3回洗浄した。沈殿菌体を1.5 mlの同様の緩衝液に再懸濁し終濃度2.5 mMの $\alpha$ -ヒドロキシイソブチロニトリルを添加し25℃で10時間振盪しながら反応を行った。反応終了後、各々の反応液を遠心分離し菌体を除去し遠心上清中の $\alpha$ -ヒドロキシイソ酪酸の含量を液体クロマトグラフィー (カラム: SHODEX ODS F511A、キャリア: 0.2 M  $H_3PO_4$ 、30℃、モニター: 208 nm) により分析した。なお比較のため、

特開昭61-56086号公報記載のコリネバクテリウム ニトリロフィラス ATCC 21419 株について、も上記同様に培養および加水分解反応を行った。結果を表1に示した。

表 1

菌 株	誘導物質	使用菌体量 (OD <sub>630nm</sub> )	$\alpha$ -ヒドロキシ シイソ酪酸 生成量 ( $\mu$ M)
ロドコッカス エリスロポリス ATCC 12674 ATCC 19140 ATCC 33258	IBN	13	17
	IBN	30	19
	IBN	31	20
ロドコッカス エリスロポリス IPM 155 IPO 12320 IPO 12538	IBN	36	18
	IBN	12	16
	IBN	30	22
グルデアケツタリウム アセツタリウム IAM 1790	IBN	32	18
ウェルシュ SM13	CPN	14	13
アースロバクテリウム HRI	CPN	17	15
コリネバクテリウム ニトリロフィラス ATCC 21419	IBN	18	0.7

## 実施例 2

## (1) 培 養

ロドコッカス エリスロポリス IPO 12538 を実施例1と同様に培養した。

## (2) 加水分解反応

実施例1と同様にして調製した固体懸濁液に25  $\mu$ Mの $\alpha$ -ヒドロキシシイソプロニトリルを加え実施例1と同じ条件で反応した。反応開始2時間と3時間後に各々25  $\mu$ Mの $\alpha$ -ヒドロキシシイソプロニトリルを再び加え合計75  $\mu$ M添加した。4時間後、反応液を遠心分離することにより除菌し、上清中の $\alpha$ -ヒドロキシシイソ酪酸含量を実施例1と同様に定量し、結果を表2に示した。

表 2

菌 株	誘導物質	使用菌体量 (OD <sub>630nm</sub> )	$\alpha$ -ヒドロキシ シイソ酪酸 生成量 ( $\mu$ M)
ロドコッカス エリスロポリス IPO 12538	IBN	50	69

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第1部門第1区分  
 【発行日】平成10年(1998)12月2日

【公開番号】特開平4-40897  
 【公開日】平成4年(1992)2月12日  
 【年通号数】公開特許公報4-409  
 【出願番号】特願平2-148725  
 【国際特許分類第6版】

C12P 7/42  
 //(C12P 7/42  
 C12R 1:01 )  
 (C12P 7/42  
 C12R 1:38 )  
 (C12P 7/42  
 C12R 1:06 )  
 (C12P 7/42  
 C12R 1:13 )  
 【F I】  
 C12P 7/42

手 続 補 正 書

平成9年5月9日

特許庁長官 荒井 秀光 殿

1. 事件の表示  
 平成2年特許第148725号
2. 発明の名称  
 α-ヒドロキシイソ酪酸の生物学的製造法
3. 補正をする者  
 事件との関係 特許出願人  
 〒104 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号  
 (395) 日東化学工業株式会社  
 代表者 片岡 良  
 電話 東京3271-3081
4. 補正命令の日付 白紙補正
5. 補正により増加する請求項の数 なし
6. 補正の対象  
 明細書の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容  
 (1) 明細書第5頁第2～3行の「教工研開第11309号」を「教工研公第3325号」に訂正します。  
 (2) 明細書第5頁第3～4行の「教工研開第11301号」を「教工研公第3323号」に訂正します。

以 上

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**